

MASKING BACKGROUND FLUORESCENCE AND LUMINESCENCE IN
OPTICAL ANALYSIS OF BIOMEDICAL ASSAYS

Patent Number: US2002022274 (US02022274)

Publication date: 2002-02-21

Inventor(s): PAFFHAUSEN WOLFGANG (DE); BECHEM MARTIN (DE); KRAHN
THOMAS (DE); SCHADE ANDREAS (DE); SCHMIDT DELF (DE)

Applicant(s)::

Requested Patent: DE19621312

Application Number: US19980194099 19981120

Priority Number(s): DE19961021312 19960528

IPC Classification: G01N33/567

EC Classification: G01N33/53D, G01N33/543M

Equivalents: EP0906572 (WO9745739), B1, JP2000512746T, WO9745739

Abstract

Data supplied from the esp@cenet database - 12



②1 Aktenzeichen: 196 21 312.6
②2 Anmeldetag: 28. 5. 96
②3 Offenlegungstag: 4. 12. 97

⑦1 Anmelder:
Bayer AG, 51373 Leverkusen, DE

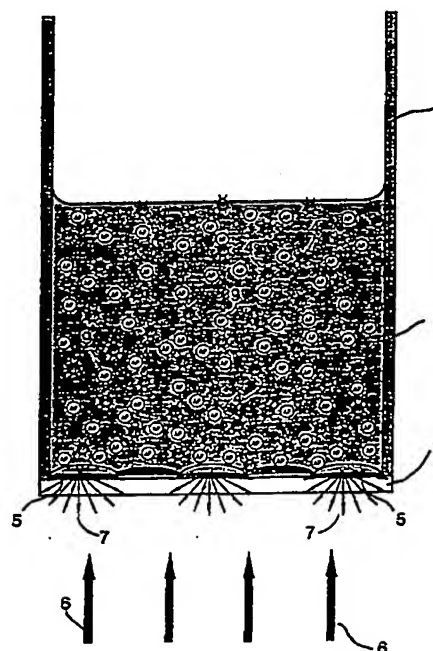
⑦2 Erfinder:
Krahn, Thomas, Dr., 58135 Hagen, DE; Paffhausen,
Wolfgang, Dr., 51381 Leverkusen, DE; Schade,
Andreas, Dipl.-Ing., 54277 Essen, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE	32 13 183 C2
DE	32 26 332 A1
US	51 64 301
US	46 65 024
US	46 39 421
US	46 13 567
EP	07 08 334 A2
EP	05 58 827 A1
WO	94 17 388 A1
WO	93 23 492 A1
WO	93 02 208 A1

⑤4 Maskierung der Hintergrundfluoreszenz und Signalverstärkung bei der optischen Analyse biologisch
medizinischer Assays

⑤7 Bei einem Verfahren zur quantitativen optischen Analyse von fluoreszenzmarkierten biologischen Zellen (5) steht eine Zellschicht auf einem transparenten Träger am Boden (2) eines Reaktionsgefäßes (1) mit einer den Fluoreszenzfarbstoff (4) enthaltenden Lösung (3) in Kontakt. Die Empfindlichkeit des analytischen Nachweises kann erheblich verbessert werden, wenn der Lösung (3) zusätzlich zu dem bereits vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff (4) ein Maskierungsfarbstoff (9) hinzugegeben wird, welcher das Anregungslicht (6) für den Fluoreszenzfarbstoff (4) und/oder sein Emissionslicht (7) absorbiert. Anstelle des Maskierungsfarbstoffes (9) in der Lösung kann auf die Zellschicht am Boden (2) auch eine für die Lösung durchlässige, das Anregungslicht (6) oder das Emissionslicht (7) absorbierende und/oder reflektierende Trennschicht (10) aufgebracht werden. Dieses Verfahren kann auch zur Verbesserung der Empfindlichkeit bei der quantitativen optischen Analyse einer lumineszenten biologischen Zellschicht angewandt werden. Die Trennschicht (10) muß in diesem Fall so beschaffen sein, daß sie ein hohes Reflexionsvermögen für das Lumineszenzlicht (11) besitzt.



Beschreibung

Die Erfindung geht aus von einem Verfahren zur quantitativen optischen Analyse von fluoreszenzmarkierten, mit einer Fluoreszenzfarbstofflösung in Kontakt stehenden oder von lumineszenten Zellen, die in Form einer zusammenhängenden Zellschicht auf einem transparenten Träger am Boden eines Reaktionsgefäßes aufgebracht sind.

Für die quantitative Analyse von fluoreszenzmarkierten oder lumineszenten Zellen, die adhären auf transparenten Trägermaterialien bzw. in Gefäßen mit transparenten Böden wachsen (im weiteren als Reaktionsgefäß bezeichnet), wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem die durch die Anregung gekoppelte, unspezifische Fluoreszenz eines Fluoreszenzfarbstoffes, der sich nicht nur in der Zelle befindet, sondern auch ständig gelöst im Zellüberstand vorliegen muß, vollständig unterdrückt werden kann. Dies trifft vornehmlich auf die Farbstoffe zu, die zu der Klasse der Verteilungsfarbstoffe gehören, und die nach Eindringen in die Zellen nicht aus der Lösung entfernt werden dürfen, weil sonst die Fluoreszenzmarkierung durch Diffusion in die extrazelluläre Phase verloren geht. Desweiteren wurde ein modifiziertes Verfahren entwickelt, bei dem die unspezifische Fluoreszenz durch Einbringen einer Trennschicht von der spezifischen Fluoreszenz getrennt wird. Das Einbringen einer reflektierenden Trennschicht verstärkt die spezifische Fluoreszenz, aber auch die Lumineszenz von biologischen Zellen durch Rückreflexion in Richtung des Meßsensors.

Stand der Technik

Ein Problem bei der Fluoreszenzmessung in biologisch medizinischen Assays besteht häufig darin, daß die mit der biologischen Zellaktion korrelierten Fluoreszenzänderungen klein gegenüber der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz sind. Dadurch wird das Auflösungsvermögen stark eingeschränkt. Herkömmliche kommerzielle Meßsysteme (Fluoreszenzreader, Fa. Dynatech bzw. SLT) können das Problem nicht lösen, weil durch ihre optischen Meßanordnung (Anregung von "oben" durch die fluorezente Flüssigkeitssäule des Überstands) das Signal im Vergleich zum Hintergrund kaum detektiert werden kann. Geräte neuerer Konstruktion (Fa. Labsystems), die die Zellen von der Rückseite durch den transparenten Träger des Reaktionsgefäßes beleuchten, haben zwar den Vorteil, daß bei Eintritt des Anregungslichts die Zellen zur Fluoreszenz angeregt werden. Da das Anregungslicht aber weiter in den ebenfalls fluoreszenten Überstand eintritt, läßt es sich nicht vermeiden, daß das unspezifische Hintergrundsignal das Zellsignal verfälscht. Selbst sehr aufwendige Meßsysteme (Fa. NovelTech, FLIPR: Fluorescence Imaging Plate Reader) können mit einer speziellen Laser-Beleuchtungsgeometrie (Anregung unter ca. 45°) diese Hintergrundfluoreszenz nur vermindern. Grund für das Scheitern aller Problemlösungsversuche über die Meßgeometrie ist der Umstand, daß hierüber die eigentliche Ursache für die Hintergrundfluoreszenz nicht entscheidend beeinflusst werden kann.

Aufgabe

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Empfindlichkeit der optischen Analyse von fluoreszenzmarkierten oder lumineszenten Zellen in einem zellulären

Assay zu verbessern, z. B. möglichst geringe Membranpotentialänderungen auf der Basis von Fluoreszenzänderungen potentialsensitiver Farbstoffe messen zu können. Dabei soll die Empfindlichkeit des Meßsystems so hoch sein, daß sich Potentialänderungen unter 5 mV mindestens qualitativ nachweisen lassen. Im Falle von lumineszenten Zellen soll eine Steigerung in der Detektion des Lumineszenzsignals erreicht werden. Außerdem soll die Methode für ein Screening mit hohem Probendurchsatz geeignet sein.

Lösung

Die geforderte hohe Auflösung bei geringen Membranpotentialänderungen konnte erst erzielt werden, nachdem die Ursache für die störende Überlagerung der unspezifischen Hintergrund- und der spezifischen Fluoreszenz der Zellen beseitigt werden konnte. Das hierzu entwickelte erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der grundsätzlich neuen Idee, die Anregungsenergie und die nicht von dem biologischen Objekt stammende Fluoreszenz zu maskieren. Hierzu wird neben dem Fluoreszenzfarbstoff ein weiterer Farbstoff hinzugefügt, der das Anregungslicht des Fluoreszenzfarbstoffs und/oder dessen Emissionslicht vollkommen absorbiert, ohne die Fluoreszenz der Zellen zu beeinflussen. Durch diese Absorption wird erreicht, daß das unspezifische Hintergrundsignal maskiert und das Zell-Nutzsignal mit einer bisher nicht möglichen Auflösung detektiert werden kann.

Eine im Rahmen der Erfindung liegende Alternativlösung besteht darin, daß auf die Zellschicht eine für die Lösung durchlässige Trennschicht aufgebracht wird, die das Anregungslicht für den Fluoreszenzfarbstoff und/oder sein Emissionslicht absorbiert und/oder reflektiert, ohne die Zelleigenschaften negativ zu beeinflussen. Dabei wird die Dicke der Trennschicht so gewählt, daß im Lösungsansatz mit dem Fluoreszenzfarbstoff aber ohne die Zellen keine Fluoreszenz mehr nachweisbar ist.

Eine weitere Variante der Erfindung besteht darin, daß die Methode der erfindungsgemäßen Trennschicht auch zur Empfindlichkeitssteigerung bei der quantitativen optischen Analyse von lumineszenten (selbstleuchtenden) biologischen Zellen verwendet wird, die in Form einer zusammenhängenden Zellschicht auf einem transparenten Träger aufgebracht sind. Zu diesem Zweck wird die für die Lösung durchlässige Trennschicht so gewählt, daß sie das Lumineszenzlicht möglichst stark reflektiert, ohne die Zelleigenschaften negativ zu beeinflussen. Auf diese Weise kann die Lumineszenzintensität und damit der Meßeffect beträchtlich erhöht werden.

Vorzugsweise besteht die Trennschicht aus polymeren Latexkügelchen (z. B. Polystyrol, Polyurethan, Butadien Acrylnitril). Die Latexkügelchen können dabei auch mit einem Maskierungsfarbstoff gefärbt sein, der in diesem Fall eine hinreichend große Polymeranfärbbarkeit aufweisen muß.

Bei dem zuerst erwähnten Verfahren soll sich der Maskierungsfarbstoff möglichst gut in der Lösung, die auch den Fluoreszenzfarbstoff in gelöster Form enthält, verteilen. Da das Lösungsmittel in der Regel Wasser ist, wird zweckmäßig ein Maskierungsfarbstoff eingesetzt, der eine gute Wasserlöslichkeit besitzt ($> 2 \text{ g/ml}$) und keine zelltoxischen Nebeneffekte aufweist.

Gemäß einer Weiterentwicklung der Erfindung wird nach dem Austausch des einen Fluoreszenzfarbstoff enthaltenden Überstandes durch eine Fluoreszenzfarb-

stoff-freie Lösung ein weiterer Maskierungsfarbstoff zugegeben, welcher eine unspezifische Fluoreszenz an der Reaktionsgefäßwand unterdrückt.

Vorteile

Mit der Erfindung werden folgende Vorteile erzielt:

Das beschriebene neue Verfahren ist nicht an ein bestimmtes Meßsystem gebunden, sondern kann, weil es keine spezifisch technische Lösung darstellt, von vielen handelsüblichen Geräten benutzt werden. Hierzu zählen praktisch alle Fluoreszenzreader, die transparente Reaktionsgefäße z. B. Mikrotiterplatten von der Unterseite her beleuchten und auch messen können. Mit einem sehr geringen Aufwand (minimale Zusatzkosten nur für die speziellen Absorptionsfarbstoffe) wird es hierdurch erstmals möglich, in einen Auflösungsbereich z. B. bei der Messung von Potentialänderungen in Zellmembranen durch Messung der Fluoreszenzänderung potentialsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe vorzudringen, der bisher unerreichbar war. Erstmals wird es möglich, auch bei sehr kleinen Änderungen einen direkten Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Reaktionsgefäßen (z. B. verschiedene Vertiefungen in einer Mikrotiterplatte) durchzuführen, so daß auf das aufwendige Verfahren der Bestimmung der relativen Änderung in einem Reaktionsgefäß verzichtet werden kann. Dadurch verringert sich die Anzahl der zu erfassenden Meßwerte z. B. für Kinetikmessungen. Der zeitliche Aufwand für ein Meßprogramm wird deutlich reduziert und die Möglichkeit geschaffen, durch eine simple Einzelmessung (z. B. Endpunktbestimmung) unter Verwendung des Bezugs auf einen getrennten Kontrollansatz gleiche Resultate zu erhalten. Die hierbei geforderte Uniformität des biologischen Ansatz (z. B. homogene Zellschicht) ist z. B. für Mikrotiterplatten im allgemeinen gegeben.

Überraschenderweise zeigte die Anwendung verschiedener wasserlöslicher Farbstoffe und auch deren Mischungen in den verschiedensten getesteten Zellen keine negative Auswirkung auf die Physiologie der Zellen (z. B. Reaktion der Zellen im Vergleich zu elektrophysiologischen Messungen wie Whole-cell-patch-clamp, bzw. Effekte der untersuchten Pharmaka). Auch der Einsatz von unlöslichen Farbpigmenten bzw. anorganischen feinverteilten Teilchen wurde erstaunlich gut von den biologischen Objekten toleriert.

Durch das beschriebene einfache Verfahren der Maskierung der Hintergrundfluoreszenz bei der quantitativen Fluoreszenzmessung in biologisch medizinischen Assays verbunden mit einer Steigerung der Empfindlichkeit z. B. beim Einsatz von potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen und die Adaptionfähigkeit dieses Verfahrens z. B. auf Mikrotiterplatten als Reaktionsgefäße wird der Einsatz solcher Meßtechniken das High-Throughput-Screening wesentlich vereinfachen, zumal zur Realisierung der geschilderten Vorteile kein erhöhter technischer Aufwand notwendig ist, sondern vorhandene kommerzielle Meßgeräte dazu ausreichen.

Ausführliche Beschreibung

Im Folgenden wird die Erfindung an Hand von Ausführungsbeispielen und Zeichnungen näher erläutert: Es zeigen:

Fig. 1 ein Reaktionsgefäß für einen Fluoreszenzassay nach dem Stand der Technik,

Fig. 2 die Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz bei einem Fluoreszenzassay mit einem Maskierungsfarbstoff im Überstand,

Fig. 3 die spektrale Anregung und Emission für einen Verteilungsfarbstoff und die spektrale Absorption des Maskierungsfarbstoffes,

Fig. 4 die ortsabhängige Zellfluoreszenz ohne Maskierungsfarbstoff,

Fig. 5 die ortsabhängige Zellfluoreszenz mit Maskierungsfarbstoff,

Fig. 6 die Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz bei einem Fluoreszenzassay mit Hilfe einer Trennschicht,

Fig. 7 die Verstärkung der Lumineszenz durch Rückreflexion an einer Trennschicht,

Fig. 8 die Wandfluoreszenz bei einem Fluoreszenzassay nach dem St. d. T.,

Fig. 9 die Unterdrückung der Wandfluoreszenz bei einem Fluoreszenzassay mit Hilfe eines Maskierungsfarbstoffes.

In Fig. 1 ist ein Reaktionsgefäß 1 für ein Fluoreszenzassay mit einem transparenten Boden 2 dargestellt. In dem Reaktionsgefäß 1 befindet sich eine Fluoreszenzfarbstofflösung 3, in der die Fluoreszenzfarbstoffmoleküle 4 schematisch angedeutet sind. Die Lösung 3 wird auch als Überstand bezeichnet. Auf dem transparenten Boden 2 sind die zu untersuchenden biologischen Zellen angeordnet. Durch den Boden 2 wird Licht (Anregungslicht) 6 eingestrahlt, um die Zellen 5 zur Fluoreszenz anzuregen. Dem von den Zellen 5 ausgestrahlten Fluoreszenzlicht 7 ist eine Hintergrundfluoreszenz-Strahlung 8 überlagert, die von den ebenfalls angeregten Fluoreszenzfarbstoffmolekülen 4 im Überstand 3 herrührt. Für die biologisch-analytische Untersuchung und Auswertung der Zellen 5 ist aber nur das Fluoreszenzlicht 7 maßgebend. Da aber bei allen bekannten Fluoreszenz-Analysegeräten die Hintergrundfluoreszenz 8 mit erfaßt wird, gehen kleine Fluoreszenzunterschiede der Zellen 5 vor der starken Hintergrundfluoreszenz 8 unter, was zu einem deutlichen Empfindlichkeitsverlust führt.

Dieser Nachteil kann durch das erfindungsgemäße Verfahren nach Fig. 2 dadurch vermieden werden, daß die Hintergrundfluoreszenz durch einen Maskierungsfarbstoff im Überstand 3 unterdrückt wird. Die in Fig. 1 vorhandene Hintergrundfluoreszenz 8 wird gem. Fig. 2 vollständig im Überstand absorbiert. Der zu dem Überstand 3 hinzugefügte Maskierungsfarbstoff (schematisch mit 9 bezeichnet) kann entweder in gelöster Form oder in fein verteilter disperser Phase (farbpigmentierte Systeme) vorliegen. Bevorzugt werden jedoch lösliche Farbstoffe eingesetzt, weil hier die Zugabe besonders einfach mit Hilfe einer Pipette erfolgen kann und weil im Gegensatz zu einem Pigment-System die physikalischen Einflüsse der Teilchengrößenverteilung und von Sedimentationsprozessen und Schichtdickenungleichmäßigkeiten nicht berücksichtigt werden müssen.

An die Eigenschaften eines derartigen Farbstoffs werden folgende Anforderungen gestellt:

- bei Verwendung eines löslichen Absorptionsfarbstoffes gute Wasserlöslichkeit für den Einsatz in biologischen Assays
- keine Membrangängigkeit des Farbstoffs, um eine Anfärbung der Zellen zu vermeiden
- hohe spezifische Absorption im Excitations- und/ der Emissions-Wellenlängenbereich des Fluoreszenzfarbstoffes
- keine toxischen Nebeneffekte (Vermeidung von

Zellschädigungen).

Als gute Wasserlöslichkeit wird eine Löslichkeit von $> 2 \text{ mg/ml}$ angesehen. Die Zelttoxizität kann mit Hilfe bekannter Testverfahren (z. B. Zytotoxizitätstest) bestimmt werden. Fig. 3 zeigt die optischen (spektralen) Eigenschaften eines Fluoreszenz- und eines Maskierungsfarbstoffes in einem Diagramm. Die Kurve A zeigt die spektrale Verteilung des Anregungslichtes, die Kurve B die spektrale Verteilung des emittierten Fluoreszenzlichtes für den handelsüblichen Verteilungsfluoreszenz-Farbstoff Bis-(1,3-dibutylbarbituricacid)trimethanexonol (Dibac₄(3)) und die Kurve C die spektrale Transmission (Absorptionsspektrum) des verwendeten Maskierungsfarbstoffes (Brilliant Black BN, C.I. 28440, Food Black 1, z. B. Sigma B-8384). Man erkennt, daß der Maskierungsfarbstoff im Wellenlängenbereich der Anregung und Emission des Fluoreszenzfarbstoffes fast vollständig absorbiert.

Die Kontrastverbesserung bzw. Empfindlichkeitssteigerung läßt sich noch besser an Hand der Fig. 4 und 5 verstehen. Zur Demonstration der Wirkung des Maskierungsfarbstoffes auf die unspezifische Hintergrundfluoreszenz wurden zwei Videoaufnahmen von dem gleichen Bildausschnitt vor und nach Hinzufügen von $100 \mu\text{g/ml}$ des löslichen Maskierungsfarbstoffes Brilliant schwarz in Anwesenheit des potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Dibac₄(3) ($5 \mu\text{M}$) gemacht. Beide Male wurden dieselbe Videozeile bildanalytisch ausgewertet und die beiden Fluoreszenzintensitätsprofile über die identischen Ausschnitte im Reaktionsgefäß dargestellt. Der Bereich Z entspricht dabei dem Bereich, in dem sich die Zellschicht, d. h. die biologische Probe befindet, während rechts davon in der Zone Ü zum größten Teil das vom Überstand herkommende Fluoreszenzsignal gemessen wird. Der Meßbereich des Aufnahmesystems (8 bit) liegt zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß). Für die unmaskierte Aufnahme ergibt sich ein Kontrastverhältnis von ca. 1 : 3,6 (Intensitätsverhältnis der dunkelsten und hellsten Bildanteile) und im Falle der maskierten Aufnahme ein Kontrastverhältnis von ca. 1 : 14,4. Das entspricht einer Kontraststeigerung um den Faktor 4.

Eine alternative Möglichkeit, das Verhältnis von Nutz- zu Hintergrundsignal zu verbessern, besteht gemäß Fig. 6 in einer Überlagerung der Zellschicht mit einer feinteiligen optischen Trennschicht 10. Die Trennschicht 10 besteht zweckmäßig aus einem feinteiligen anorganischen Weißpigment, wie z. B. TiO_2 oder M_2O_3 . Hierdurch wird nicht nur die Hintergrundfluoreszenzstrahlung aus dem Überstand 3 abgeschirmt, sondern auch die meßbare Größe der Zellfluoreszenz durch Reflexion an den anorganischen Teilchen verstärkt.

Alternativ kann die Trennschicht aus polymeren Latexkügelchen mit einem Durchmesser vorzugsweise im Bereich von 200 nm bis $5 \mu\text{m}$ bestehen. Geeignete Polymere sind z. B. Polystyrol, Polyurethan, Butadien Acrylnitril. Die Latexkügelchen können auch mit einem geeigneten Maskierungsfarbstoff angefärbt werden, für den die gleichen Kriterien gelten, wie für den Lösung zugefügten Absorptionsfarbstoff (s. oben). Eine geeignete Farbstoffklasse sind z. B. Resoline.

In Lumineszenz-Assays (selbstleuchtende Zellen) besteht grundsätzlich die Anforderung, die spezifisch sehr geringe Lichtintensität einer biologischen Zelle mit hoher Empfindlichkeit zu detektieren. Durch Einbringen einer reflektierenden Trennschicht 10 gemäß Fig. 7 kann, analog zur Methode der Unterdrückung der Hin-

tergrundfluoreszenz (gem. Fig. 6), das Lumineszenzsignal der biologischen Zellen verstärkt werden. Hierbei werden Strahlungsanteile 11 des ungerichteten Lumineszenzlichtes in Richtung des Detektors reflektiert und erhöhen so das spezifische Meßsignal.

Bei einer Vielzahl anderer fluoreszenter Testverfahren an biologischen Zellen ist es im Gegensatz zu Verteilungsfarbstoffen möglich, den Fluoreszenzfarbstoff nach Anfärbung der Zellen durch Lösungswechsel aus dem Überstand zu entfernen. Der Fluoreszenzfarbstoff FURA2-AM wird z. B. nach Eindringen in die Zelle in den freien Farbstoff gespalten und verliert hierbei seine Zellmembranpermeabilität. Dadurch kommt es zu einer Anreicherung des impermeablen Fluoreszenzfarbstoffes in der Zelle. In diesem Fall kann der fluoreszente Überstand 3 durch eine Fluoreszenzfarbstoff-freie Lösung 3a ausgetauscht werden, ohne die spezifische Zellfluoreszenz zu verändern. Die unspezifische Hintergrundfluoreszenz des Überstandes wird auf diese Weise entfernt. FURA2-AM färbt jedoch Reaktionsgefäße nachhaltig an (Wandfluoreszenz) und erzeugt so ein anderes unspezifisches Fluoreszenzsignal, das der Hintergrundfluoreszenz von Verteilungsfarbstoffen vergleichbar ist. Dieser Sachverhalt ist in Fig. 8 dargestellt. In diesem Fall geht also die Hintergrundfluoreszenzstrahlung 8 auf die an den Gefäßwänden anhaftenden Fluoreszenzfarbstoffmoleküle 4 zurück. Durch Einbringung von Maskierungsfarbstoffen in den Fluoreszenzfarbstoff-freien Überstand 3a kann auch dieses unspezifische Fluoreszenzsignal vollständig unterdrückt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen optischen Analyse von fluoreszenzmarkierten biologischen Zellen (5), die in Form einer zusammenhängenden Zellschicht auf einem transparenten Träger am Boden (2) eines Reaktionsgefäßes (1) aufgebracht sind und mit einer den Fluoreszenzfarbstoff (4) enthaltenden Lösung (3) in Kontakt stehen, dadurch gekennzeichnet, daß der Lösung (3) zusätzlich zu dem bereits vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff (4) ein Maskierungsfarbstoff (9) hinzugegeben wird, welcher das Anregungslicht (6) für den Fluoreszenzfarbstoff (4) und/oder sein Emissionslicht (7) absorbiert, ohne die Zelleigenschaften negativ zu beeinflussen.

2. Verfahren zur quantitativen optischen Analyse von fluoreszenzmarkierten biologischen Zellen, die in Form einer zusammenhängenden Zellschicht auf einem transparenten Träger am Boden (2) eines Reaktionsgefäßes (1) aufgebracht sind und mit einer den Fluoreszenzfarbstoff (4) enthaltenden Lösung (3) in Kontakt stehen, dadurch gekennzeichnet, daß auf die Zellschicht eine für die Lösung durchlässige Trennschicht (10) aufgebracht wird, die das Anregungslicht (6) für den Fluoreszenzfarbstoff (4) und/oder sein Emissionslicht (7) absorbiert und/oder reflektiert, ohne die Zelleigenschaften negativ zu beeinflussen.

3. Verfahren zur quantitativen optischen Analyse von lumineszenten (selbstleuchtend) biologischen Zellen, die in Form einer zusammenhängenden Zellschicht auf einem transparenten Träger am Boden (2) eines Reaktionsgefäßes (1) aufgebracht sind, dadurch gekennzeichnet, daß auf die Zellschicht eine für die Lösung (3) durchlässige Trennschicht (10) aufgebracht wird, die das Lumineszenzlicht (11) reflektiert, ohne die Zelleigenschaften negativ zu be-

einflussen.

4. Verfahren nach Anspruch 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet daß als Trennschicht (10) eine Schicht aus polymeren Latexkügelchen verwendet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet daß die polymeren Latexkügelchen mit einem Maskierungsfarbstoff gefärbt sind.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet daß der Maskierungsfarbstoff eine gute Wasserlöslichkeit und keine zelltoxischen Nebeneffekte aufweist.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet daß bei einem Austausch des einen Fluoreszenzfarbstoff (4) enthaltenden Überstandes (3) durch eine Fluoreszenzfarbstoff-freie Lösung (3a) ein Maskierungsfarbstoff zugegeben wird, welcher die unspezifische, von der angefärbten Reaktionsgefäßwand ausgehende Fluoreszenz unterdrückt.

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

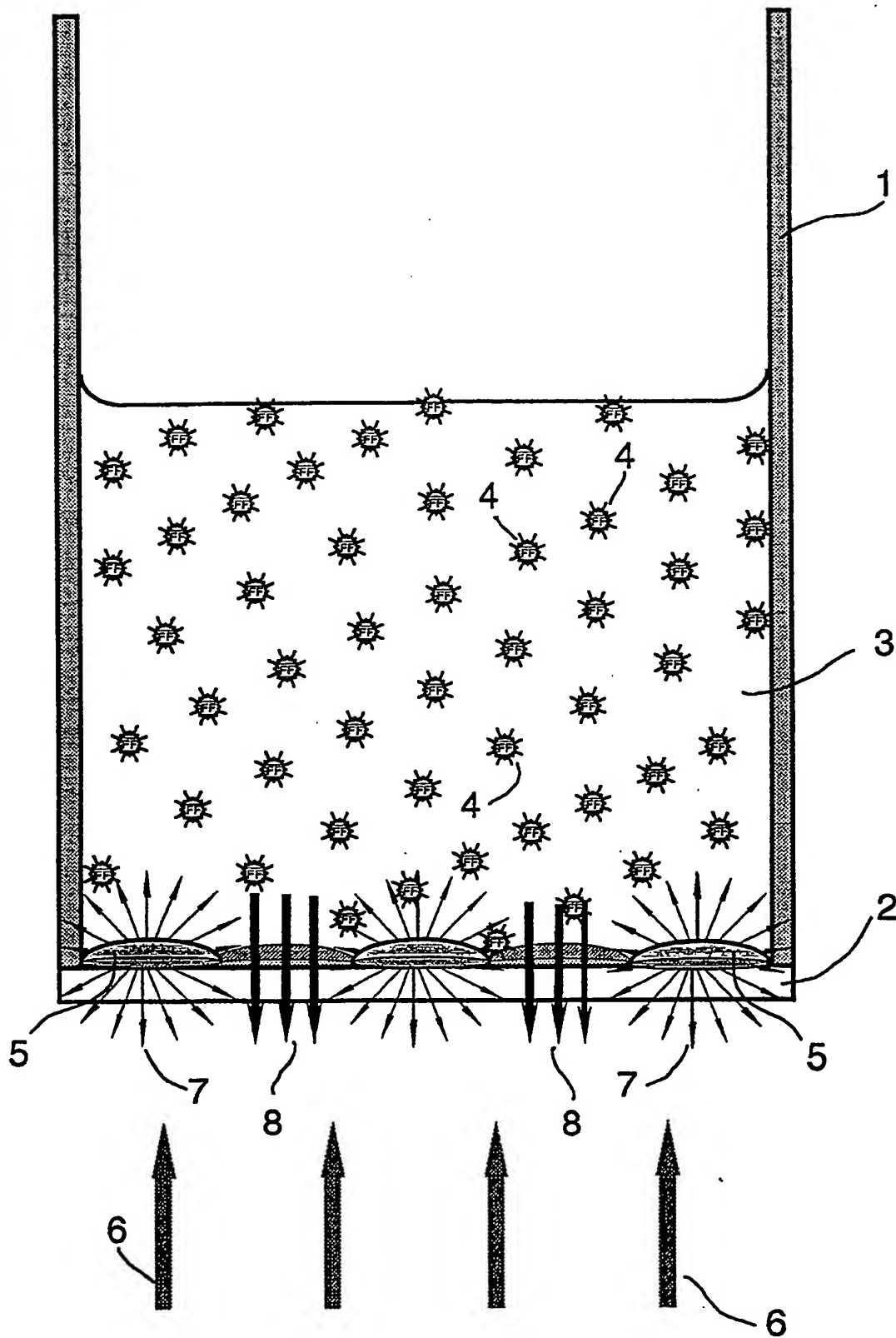
45

50

55

60

65



* Fig. 1

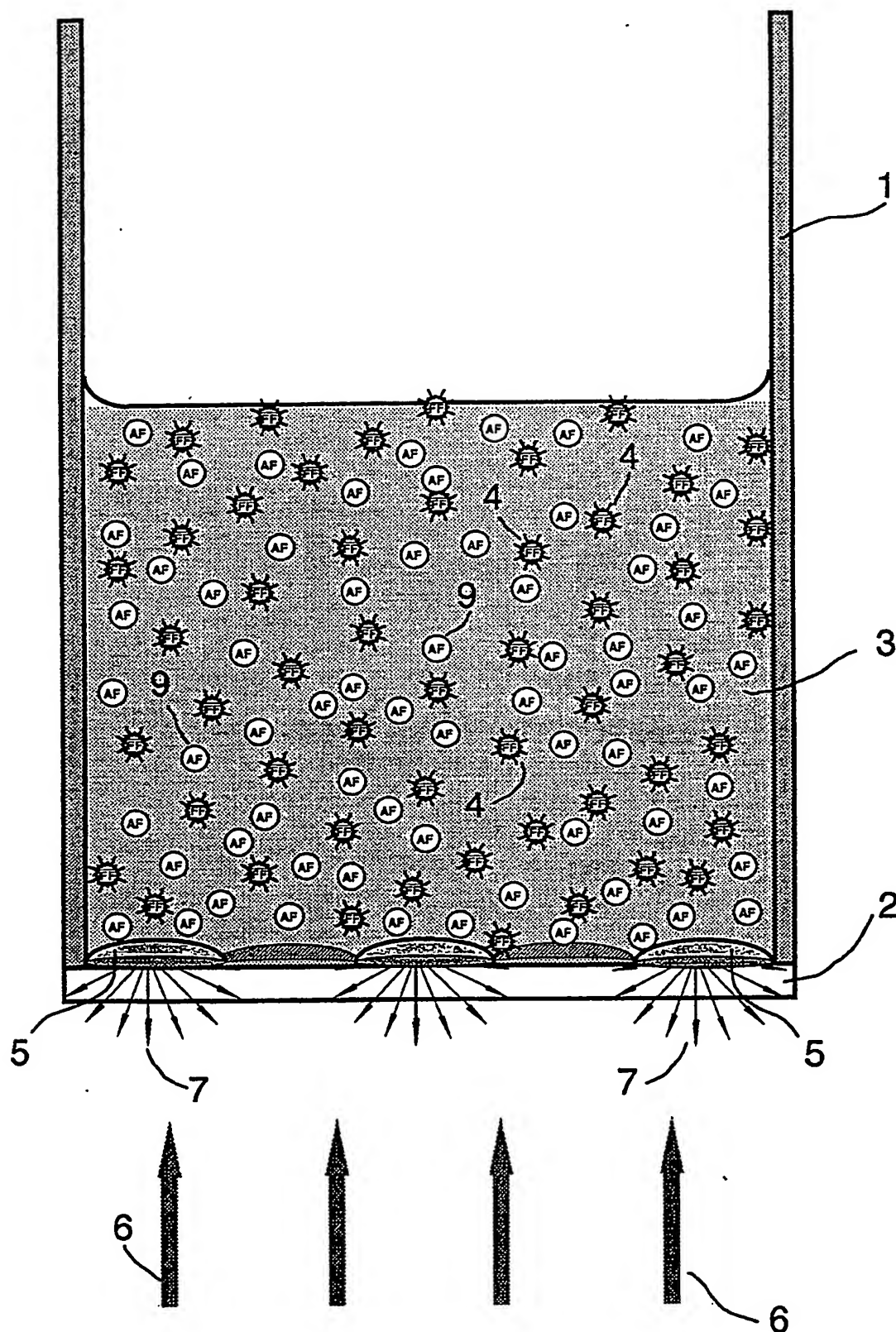


Fig. 2

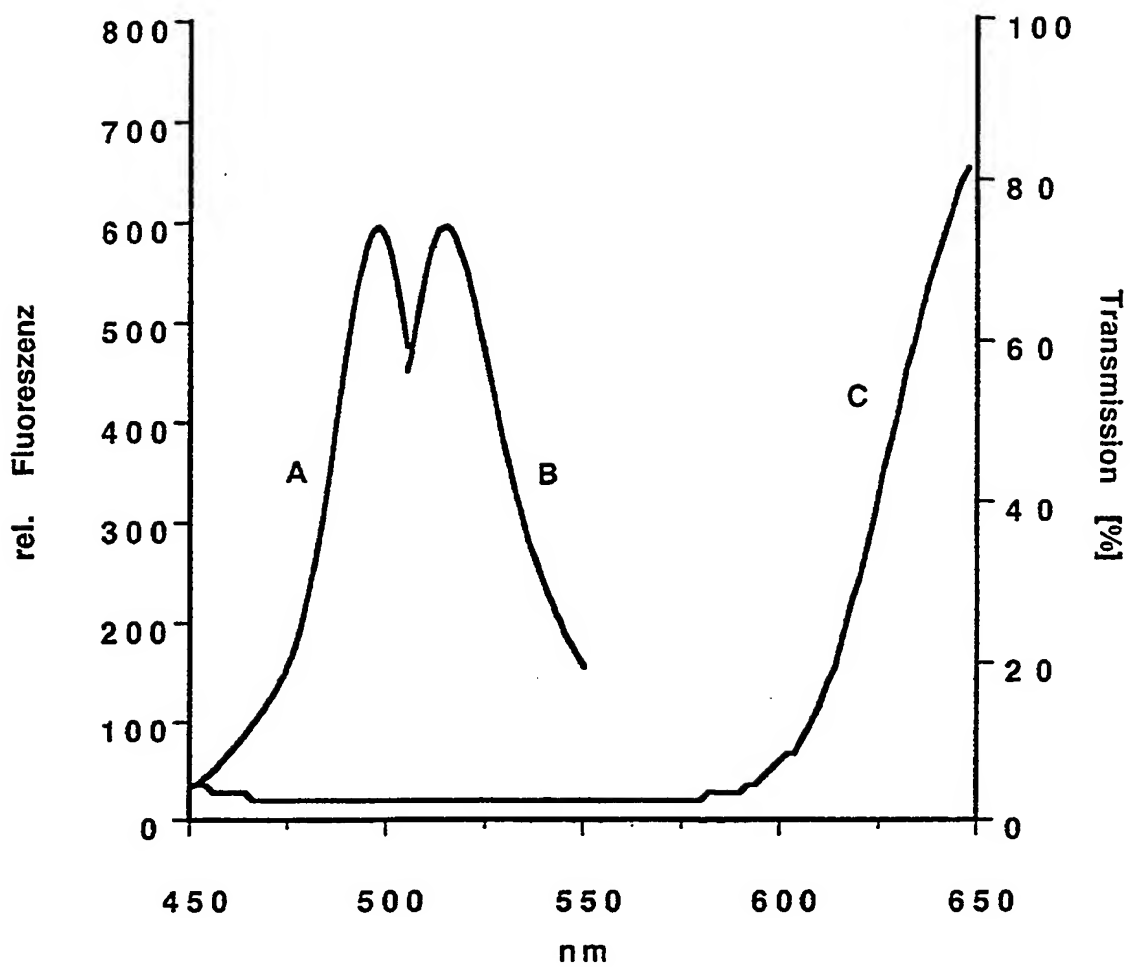


Fig. 3

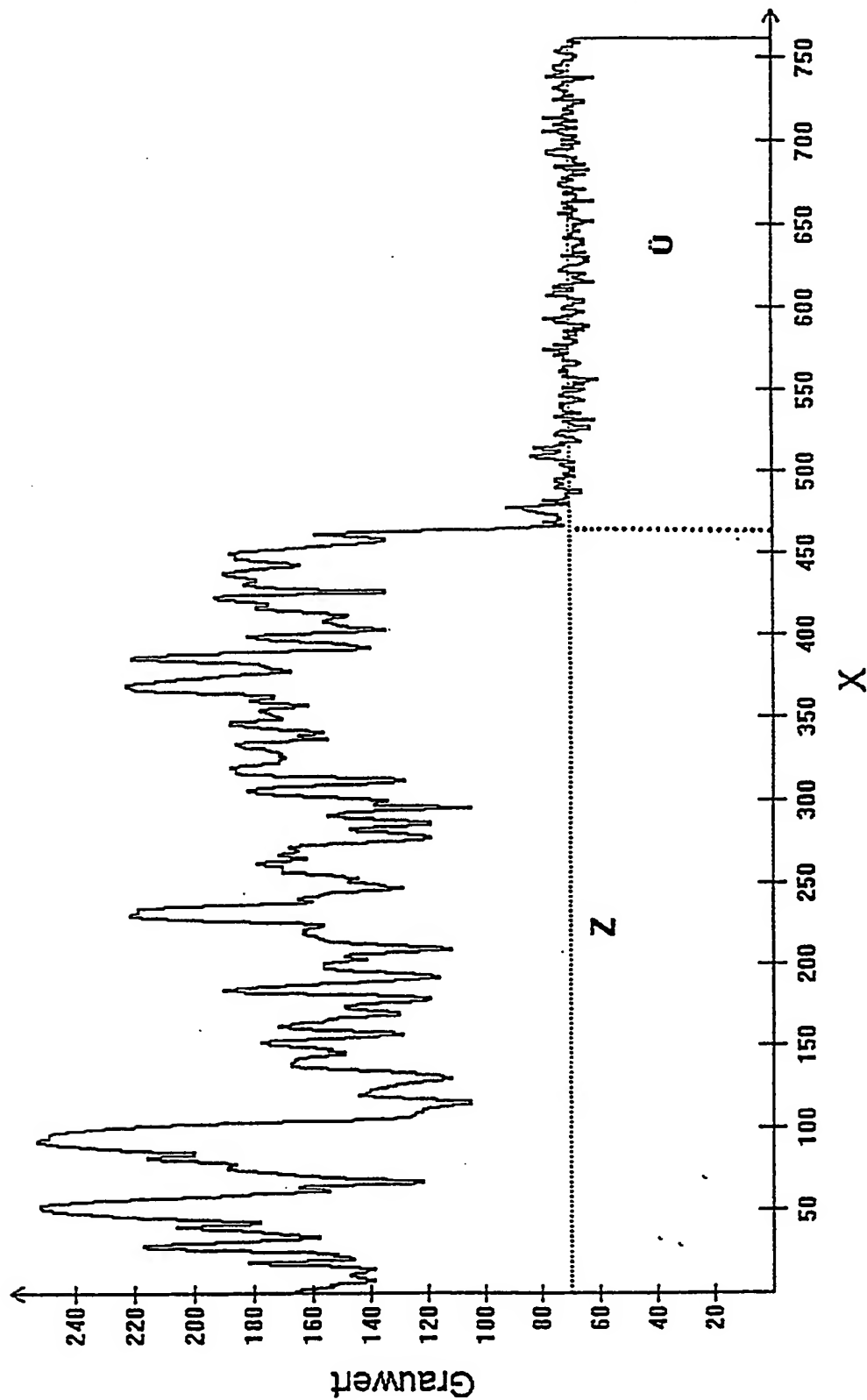


Fig. 4

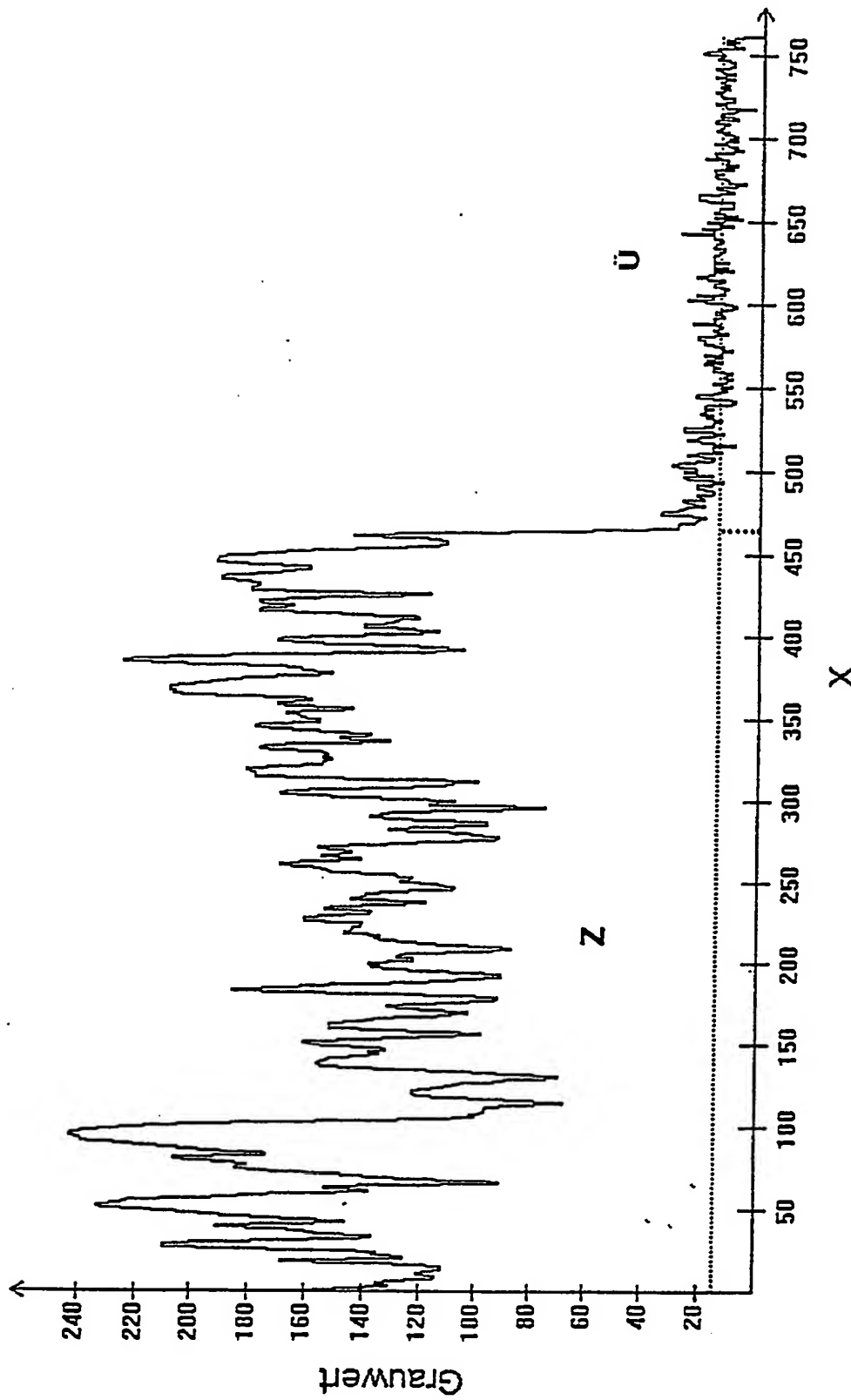


Fig. 5

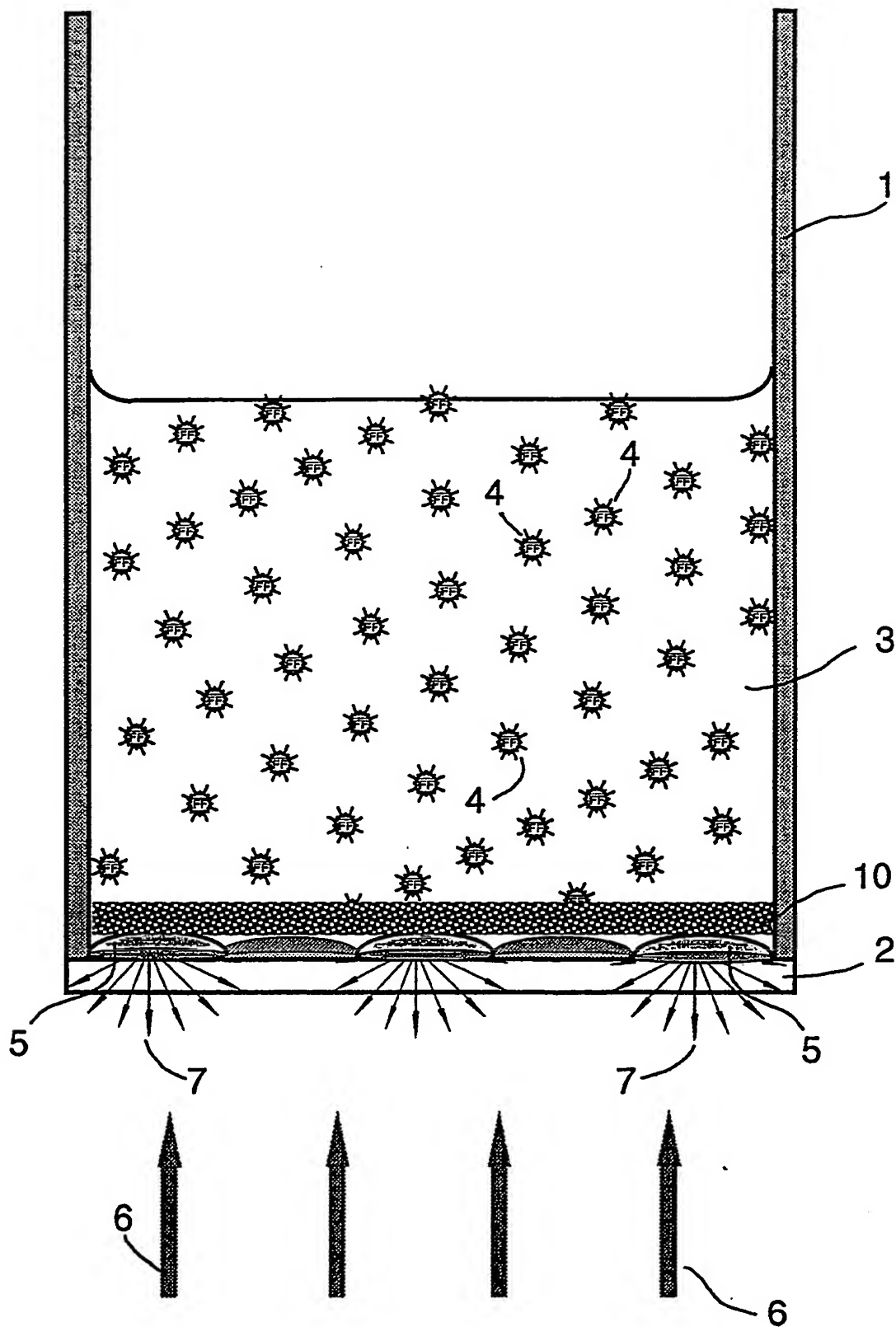


Fig. 6

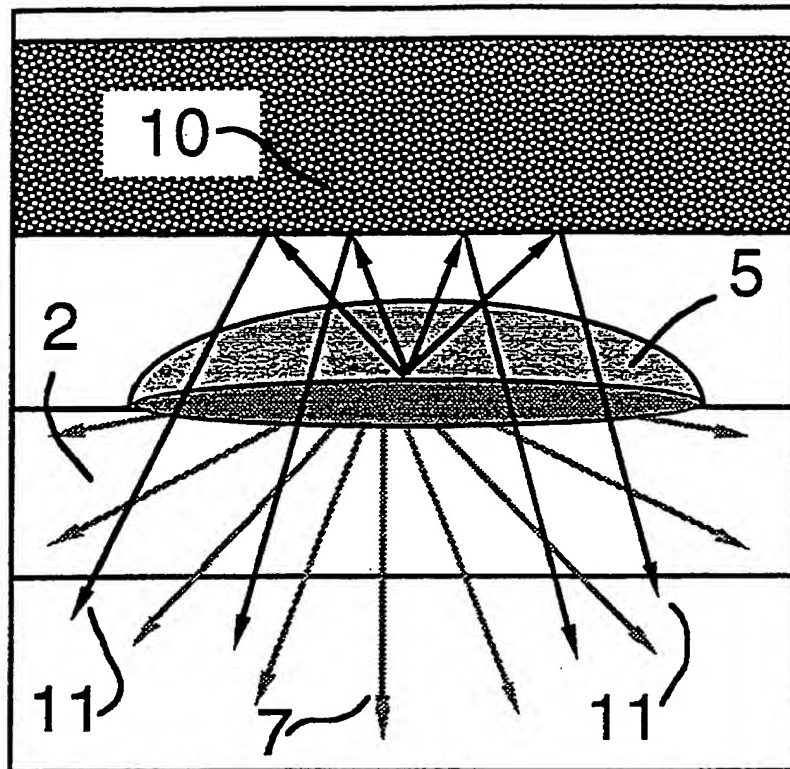


Fig. 7

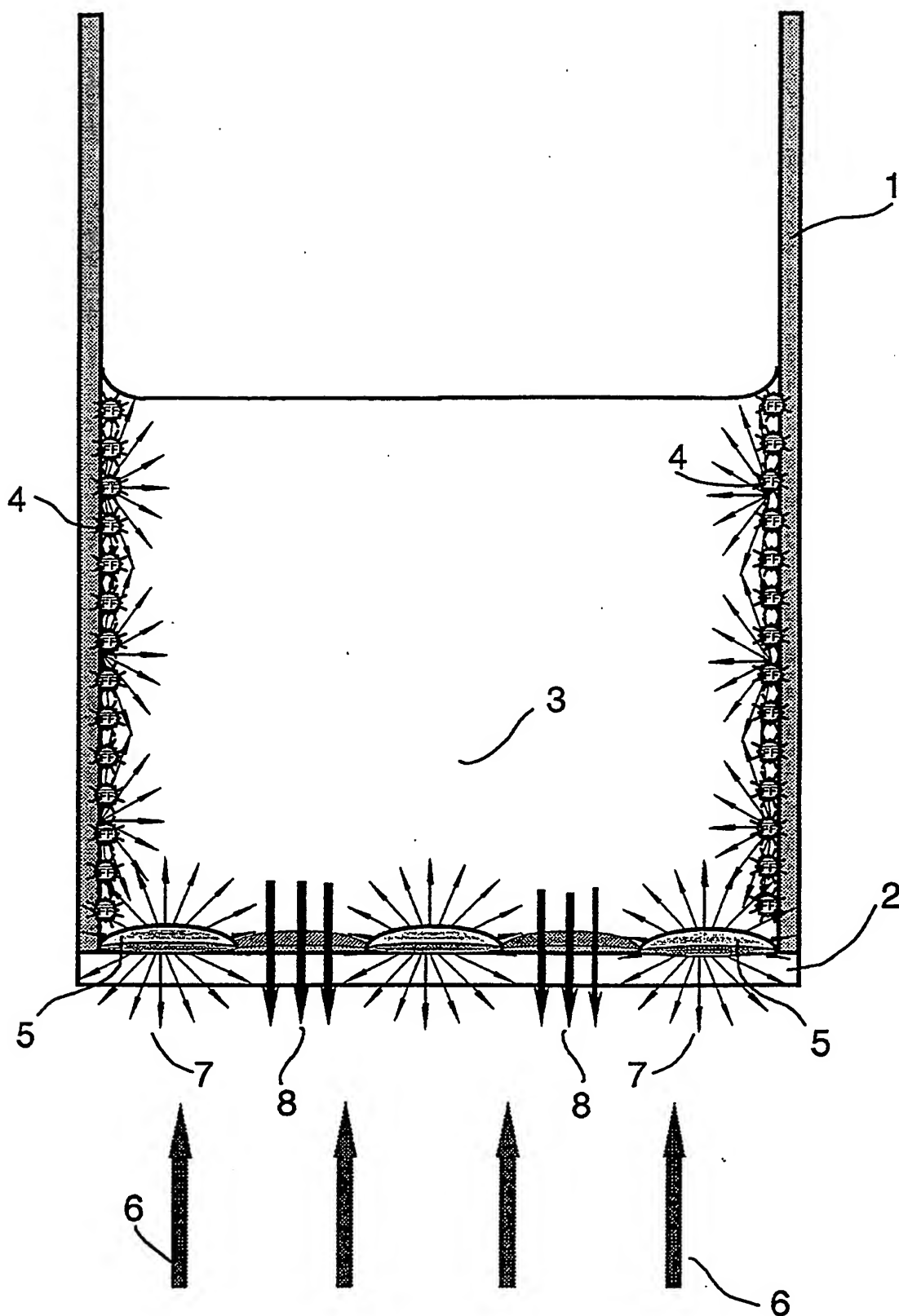


Fig. 8

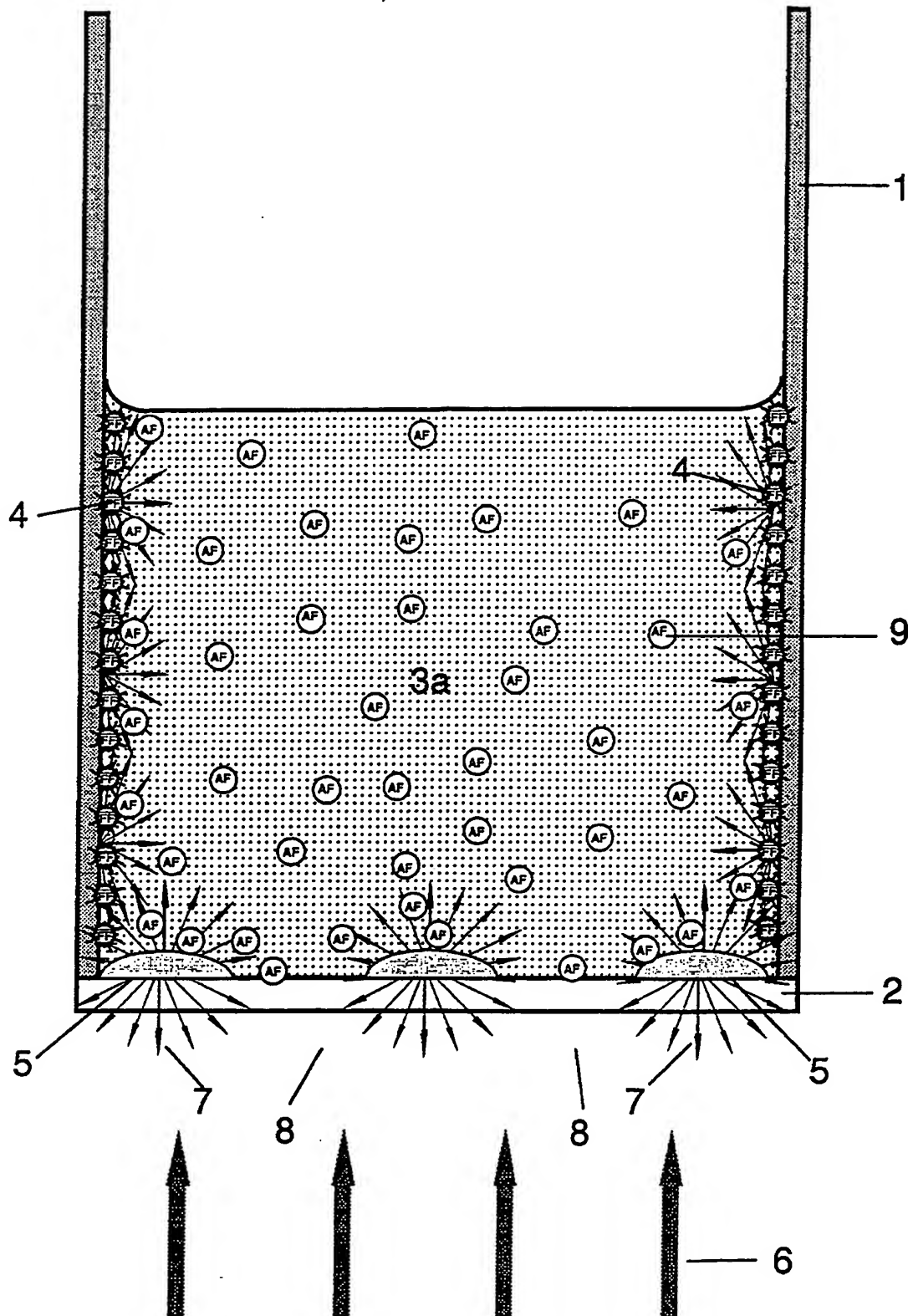


Fig. 9